

O EFEITO DOS POLIMORFISMOS T (-107) C E L55M DO GENE DA PARAOXONASE 1 E A COMPOSIÇÃO DA DIETA NA SUA ATIVIDADE SÉRICA EM MULHERES

BIANKA ZANINI¹; DRIELE NESKE²; JÉSSICA HENSE³; JOAO RINCON⁴;
GABRIEL VEIGA⁵; AUGUSTO SCHNEIDER⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – bianka_zanini@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – drika_neske@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – jeeh.hense@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas - joaoal13@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas - gabrielbveiga@icloud.com

⁶Universidade Federal de Pelotas - augustoschneider@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A paraoxonase-1 (PON1) é uma enzima secretada pelo fígado e encontrada no soro associada à lipoproteína de alta densidade (HDL) (HAREL et al., 2007), protege as lipoproteínas e membranas celulares contra a peroxidação lipídica, conferindo atividade antioxidante ao HDL e inibindo a oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (KOWALSKA, SOCHA, MILNEROWICZ, 2015). A atividade sérica da PON1 diminui à medida que o indivíduo envelhece, o que possivelmente está relacionado ao aumento do estresse oxidativo (LESCAI, MARCHEGIANI, FRANCESCHI, 2009). Além disso, dados conflitantes mostram que a atividade da enzima pode variar entre os gêneros (ABELLÓ et al., 2014; WEGNER et al., 2011). Outros fatores como tabagismo, diabetes, hipertensão e hipercolesterolemia parecem reduzir sua atividade (JAMES, LEVIEV, RIGHETTI 2000; RAJKOVIC, RUMORA, BARISIC, 2011).

Dado que os principais fatores de risco modificáveis para doenças cardiovasculares (DCV) são tabagismo, colesterol alto e hipertensão (DEAKIN AND JAMES, 2004), e que estes, por sua vez, podem influenciar a concentração e atividade de PON1 (KIM et al., 2013), diferentes estudos têm procurado associar a atividade sérica de PON1 com o desenvolvimento de DCV. Baixa atividade de PON1 parece estar associada à formação de placa aterosclerótica e, portanto, o risco de desenvolver DCV torna-se maior (ABELLÓ et al., 2014). Nesse sentido, a composição da dieta também demonstrou ser um forte modificador da atividade da PON1 (KIM et al., 2013). Estudos mostram que, a ingestão de ácidos graxos saturados (SFA), poliinsaturados e monoinsaturados (MUFA) podem modular positivamente ou negativamente a atividade da PON1 (GARCIA et al., 2014; KIM et al., 2013; KUDCHODKAR et al., 2000; MILUTINOVIC et al., 2014; WALLACE et al., 2001;). Sendo assim, mais estudos são necessários para elucidar a associação entre dieta e atividade de PON1.

Contudo, a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) no gene da PON1 também estão diretamente associados à expressão e atividade sérica da enzima (DEAKIN, JAMES 2004). Entre os SNPs descritos no gene PON1, dois são bastante comuns e estão localizados na região codificadora. Um resulta na troca de uma glutamina por uma arginina na posição 192 (Q192R) e o outro muda uma leucina por uma metionina na posição 55 (L55M) (SHE et al., 2012). Indivíduos com genótipo 55 LL apresentam atividade sérica de PON1 maior do que indivíduos com genótipo 55 MM, dependendo da composição da dieta (RANTALA et al., 2002). Além disso, outros SNPs foram identificados na região promotora do gene, localizados nas posições -107/108, -126, -160/162, -824/832 e -907/909 (RANTALA et al., 2002). O SNP conhecido como T (-107) C tem efeito na expressão gênica e consequentemente na atividade sérica de PON1. O

genótipo PON1-107 CC está associado à maior atividade sérica de PON1 e também é influenciado pela composição da dieta (SANTOS et al., 2016).

Considerando o fato de que o PON1 atua protegendo contra o desenvolvimento de DCV e que vários fatores, como os SNPs e a composição da dieta, têm impacto direto na atividade sérica de PON1, nosso objetivo foi associar a atividade sérica de PON1 em mulheres com os SNPs PON1 55 e -107 e a composição da dieta.

2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Foram utilizadas amostras de sangue oriundas de um estudo envolvendo 26 pacientes com idade acima de 18 anos, atendidas no ambulatório de Ginecologia da Faculdade de Medicina da UFPel, no período de maio a novembro de 2015. A coleta foi realizada por punção venosa, após jejum de 12 horas. Foram coletados dois tubos, um sem anticoagulante para obtenção do soro, e outro contendo EDTA, para obtenção do sangue total.

Para a extração de DNA foi utilizado protocolo previamente descrito de salting out utilizando as amostras de sangue total. Após, o DNA total foi quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) e padronizado para 100 ng/uL. Para detecção dos SNPs de interesse, foi conduzida Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) seguido por digestão enzimática e eletroforese. A PCR para identificação do *L55M* foi conduzida usando GOTaq® e os primers forward (GAAGAGTGATGTTATAGCCCCAG) e reverse (ACTCACAGAGCTAATGAAAGCCA), seguindo as recomendações do fabricante. Foram corridos 35 ciclos (95°C por 45 seg; 61°C por 45 seg e 72°C por 1 min). A digestão dos produtos de PCR foi realizada utilizando a enzima de restrição *NlaIII* (PON1 55) à 37°C durante 2 h.

A PCR para identificação do SNP T (-107) C foi realizada usando os primers forward (AGCTAGCTGCGGACCCGGCGGGAGGAG) e reverse (GGCTGCAGCCCTCACCACAACC). As condições de PCR foram idênticas às descritas acima, exceto que a temperatura de anelamento foi de 67°C. A letra minúscula no primer forward indica uma incompatibilidade que introduz um sítio de restrição para a endonuclease BsrBI (New England Biolabs), pois não há sítio de restrição específico cortando a sequência de DNA original. A digestão foi conduzida por 2 h à 37°C com enzima BsrBI.

Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (3%) corada com SYBR® Safe (Life Technologies) durante uma hora com 150V. Os produtos foram separados em virtude da diferença de tamanho. O alelo PON1 -107 C foi identificado pelos fragmentos de 28 e 212 pb no gel, enquanto o alelo T resultou no fragmento de 240 pb não digerido.

A atividade da PON1 foi avaliada nas amostras de soro utilizando um protocolo previamente descrito (BROWNE et al. 2007). A atividade da PON1 foi expressa em U/mL. O Questionário de Frequência Alimentar (QFA) foi utilizado para verificar a ingestão de gordura alimentar total e frações de SFA, MUFA e PUFA.

Os resultados foram analisados através do software GraphPad Prism 6. Foi utilizado ANOVA de duas vias para analisar o efeito do genótipo sobre a atividade sérica de PON1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A frequência do alelo para o SNP PON1 *L55M* na população analisada foi maior para o alelo *L* (69,2%) e para o alelo PON1 *T* (-107) *C* o *C* (53,8%). Neste estudo observou-se a distribuição genotípica de 56% para o genótipo *LL*, 32% para *LM* e 12% para *MM*. Em relação à distribuição do genótipo PON1 *C* (-107) *T* SNP foi de 28% para o genótipo *TT*, 41% para *TC* e 31% para *CC*. Para a frequência combinada, a distribuição foi de 7,7%, 11,5%, 26,9%, 34,6% e 19,2% para portadores de 0, 1, 2, 3 e 4 para alelos *C* e *L* favoráveis. Assim como neste estudo, o alelo *L* também é predominante na literatura, mas sua frequência difere entre as populações. Na população caucasiana da América do Norte a frequência do alelo *L* é de 64%, na população caucasiana da Europa a frequência está entre 57- 64%, na população asiática da China a frequência do alelo é de 96% e a população asiática do Japão têm frequência entre 91-94% (RAJKOVIC, RUMORA, BARISIC, 2011).

A atividade sérica média geral de PON1 foi de $99,45 \pm 4,7$ U/mL na população analisada. Ambos os SNPs tiveram um efeito significativo na atividade de PON1, indivíduos com alelos *C* e *L* tiveram maior atividade de PON1 no soro. Ao combinar os dois SNPs alelos favoráveis, observamos um forte efeito na atividade sérica de PON1 ($P < 0,05$). Houve um efeito linear de aumento do número de alelos *C* e *L* favoráveis ($P = 0,007$). Valores mais elevados de atividade enzimática para o genótipo *LL* e associação do alelo *M* à uma menor expressão da PON1 já foram evidenciados anteriormente (BROPHY et al., 2001; MACKNESS et al., 1998).

Diversos estudos tem demonstrado que a composição da dieta exerce influência sobre os níveis de atividade da PON1. Dieta rica em ácidos graxos saturados e insaturados foram associados à alterações na atividade enzimática, mas existem controvérsias em relação a influência de uma dieta aterogênica (rica em SFA sobre os níveis de PON1 (KIM et al., 2013; KUDCHODKAR et al., 2000; MILUTINOVIC et al., 2014). Ao relacionar a ingestão de SFA com a atividade da PON1, independentemente do genótipo, não foi observada diferença significativa entre as mulheres com baixa e alta ingestão ($P > 0,05$). Entretanto, ao relacionar o genótipo percebemos que em mulheres com alta ingestão de SFA a presença do alelo *M* promoveu uma redução da atividade enzimática ($P < 0,05$). Esta mesma associação negativa não é encontrada no grupo de mulheres com baixa ingestão do ácido graxo.

4. CONCLUSÕES

Estes dados indicam que não apenas o polimorfismo influência a atividade sérica da PON1, mas outros fatores como a composição da dieta também estão relacionados à mudanças na atividade da enzima. Considerando o fato de que não foi identificado um efeito negativo na atividade da PON1 nos grupos com baixa ingestão de ácidos graxos saturados, é visível que a adequação da dieta torna-se necessária afim de evitar o efeito negativo da possível presença do alelo *M* no genótipo do indivíduo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABELLÓ, D.; SANCHO, E.; CAMPS, J.; JOVEN, J. Exploring the Role of Paraoxonases in the Pathogenesis of Coronary Artery Disease: A Systematic Review. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, n. 11, p. 20997–21010, 2014.

- BROPHY, V. et al. Effects of 5' Regulatory-Region Polymorphisms on Paraoxonase-Gene (PON1) Expression. *Am. J. Hum. Genet.*, v.68, p.1428–1436, 2001
- BROWNE, R.W.; KOURY, S.T.; MARION, S.; WILDING, G.; MUTI, P.; TREVISAN, M. Accuracy and biological variation of human serum paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by kinetic enzyme assay. *Clin Chem*, v. 53, n. 2, p. 310-7, 2007.
- DEAKIN, S. P.; JAMES, R. W. Genetic and environmental factors modulating serum concentrations and activities of the antioxidant enzyme paraoxonase-1. *Clinical science*, v. 107, n. 5, p. 435–447, 2004.
- HAREL, M.; BRUMSHTEIN, B.; MEGED, R.; DVIR, H.; RAVELLI, R. B.G.; McCARTHY, A.; TOKER, L.; SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. 3-D structure of serum paraoxonase 1 sheds light on its activity, stability, solubility and crystallizability. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, v. 58, n. 3, p. 347–353, 2007.
- JAMES, R. W.; LEVIEV, I.; RIGHETTI, A. Smoking Is Associated With Reduced Serum Paraoxonase Activity and Concentration in Patients With Coronary Artery Disease. *Circulation*, v. 101, p. 2252-2257, 2000.
- KANAI, N. et al. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. *Journal of Clinical Pathology*, v. 47, n. 11, p. 1043-1044, 1994.
- KIM, D. S. et al. Pharmacogenetics of paraoxonase activity: elucidating the role of high-density lipoprotein in disease. *Pharmacogenetics*. 2013;14:1495-1515.
- KOWALSKA, K.; SOCHA, E.; MILNEROWICZ, H. Review: The Role of Paraoxonase in Cardiovascular Diseases. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 45 n. 2, p. 226-233, 2015.
- KUDCHODKAR, B. J. et al. Diet fat modulates serum paraoxonase 1 activity in rats. *Journal of nutrition*. *Biochemical and Molecular Action of Nutrients*.2000;130:2427-2433.
- LESCAI, F.; MARCHEGIANI, F.; FRANCESCHI, C. PON1 is a longevity gene: Results of a meta-analysis. *Ageing Research Reviews*, v. 8, n. 4, p. 277–284, 2009.
- PRIMO-PARMO, S. L.; SORENSEN, R. C.; TEIBER, J.; LA DU, B. N. The Human Serum Paraoxonase/Arylesterase Gene (PON1) Is One Member of a Multigene Family. *Genomics*, v. 33, p. 498–507, nº 0225, 1996.
- RAJKOVIC, M.G.; RUMORA, L.; BARISIC, K. The paraoxonase 1, 2 and 3 in humans. *Biochimia Medica*, v. 21, n. 2, p. 122-30, 2011.
- SHE, Z.; CHEN, H.; YAN, Y.; LI, H.; LIU, D. The Human Paraoxonase Gene Cluster As a Target in the Treatment of Atherosclerosis. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 16, n. 6, p. 597–632, 2012.
- RANTALA, M. et al. Dietary modifications and gene polymorphisms alter serum paraoxonase activity in healthy women. *The Journal of nutrition*, v.132, n.10, p.3012-3017, 2002.
- SANTOS, F.G. et al. The effect of the paraoxonase 1 (PON1) T (- 107) C polymorphism on serum PON1 activity in women is dependent on fatty acid intake. *Nutrition Research*, v. 36, n. 1, 2016.
- WEGNER, M.; STOLZMANN, M. P.; ARASZKIEWICZ, A.; ZIÓŁKIEWICZ, D. Z.; WYSOCKA, B. W. Evaluation of paraoxonase 1 arylesterase activity and lipid peroxide levels in patients with type 1 diabetes. *Polish Archives Of Internal Medicine*, v. 121, n. 12, 2011.